

Doris Steinemann, Martina Kinner und Reinhard Schneppenheim, Klinik für Allgemeine Pädiatrie der CAU, Kiel

## Frostschutzproteine antarktischer und arktisch-borealer Fische: Klonierung, gentechnologische Produktion und Anwendung

Gefrierschutzproteine aus dem Blut sowie verschiedener Organe antarktischer Fische sind für die Kryo-Konservierung eine sehr attraktive Substanz, da sie in höheren Konzentrationen nicht toxisch, in Puffern gut löslich sind und keine signifikante Veränderung der Osmolarität zeigen (RUBINSKY *et al.*, 1992). Bekannt sind drei Typen von „antifreeze polypeptides“ (AFP) und ein Typ des „antifreeze glycopeptide“ (AFGP). AFGP's sind Polymere des Glycotripeptids Ala-Ala-Thr, wobei das Disaccharid N-Acetyl-Galactosamin-Galaktose o-glycosidisch an die OH-Gruppe des Threonins gebunden ist. Durch die Anlagerung an Eiskristalle inhibieren die Proteine deren Wachstum, was eine Erniedrigung des Gefrierpunktes zur Folge hat. Besonders interessant ist es zu prüfen, ob diese Substanzen in der medizinischen Technologie für die Konservierung von menschlichen und tierischen Zellen, Geweben oder ganzer Organe genutzt werden können. Es konnte bereits gezeigt werden, daß AFGP und AFP die Rekristallisation in gefrorenen Geweben und Zellverbänden hemmen (KNIGHT *et al.*, 1995; YEH *et al.*, 1994).

Mit Hilfe gentechnologischer Methoden sollen die Gefrierschutzproteine auf der Basis ihrer DNS-Sequenz einer einfachen Analyse zugänglich gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst c-DNS-Genbibliotheken verschiedener Arten der Nototheniidae (*Trematomus hansonii*, *Trematomus lepidorhinus*, *Pogonophryne scotti*, *Pogonophryne marmorata*, *Aethotaxis mitopteryx*, *Bathyraco marri*, *Chaenodraco wilsoni*, *Artedidraco oraniae*, *Chionodraco myersi*, *Gerlachea australis*, *Cryodraco antarcticus*) sowie nicht-notothenioider Arten (*Muraenolepis sp.*, *Zoarcidae*) hergestellt. Die c-DNS ist das Produkt der reversen Transkription der m-RNS, die aus der Leber, dem Syntheseort der Gefrierschutzproteine, isoliert wurde. Sie enthält somit nur die codierenden und keine Intron-Sequenzen. Zur Reinigung der m-RNS aus der gesamten RNS über oligo-dT-Cellulose sowie zur Um-

schreibung in die c-DNS mit Hilfe eines oligo-dT-Primers wird der Poly-Adenin-Schwanz am 3'-Ende eukaryontischer Gene genutzt. DNS-Fragmente mit Größen zwischen 1 und 10 Kilobasen wurden in geeignete Vektoren kloniert und in *Escherichia coli* vermehrt.

Diese Genbibliotheken werden nach den für die Gefrierschutzproteine codierenden Genen mit entsprechenden Gensonden, Sequenzen, die gegen diese Gene gerichtet sind, durchsucht. Als Sonden dienen Oligonukleotide, die anhand der aus *Notothenia coriiceps* bekannten c-DNS-Sequenz des „Anti-Freeze-Glyco-Protein“ AFGP8 (HSIAO *et al.*, 1990) abgeleitet wurden. Durch Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden mit der c-DNS identifizierte positive Klone werden sequenziert, d. h. die Nukleotidabfolge der klonierten Fragmente bestimmt. Auf diese Weise identifizierte AF(G)P-c-DNS-Sequenzen sollen als spezifische Gensonden erneut zum Durchsuchen der Genbibliotheken eingesetzt werden, um die codierende Sequenz vollständig zu erfassen.

Darüberhinaus sollen gegen die Gefrierschutzproteine gerichtete Antikörper zum Auffinden der Gene dienen. Die für ein AF(G)P codierende komplette c-DNS soll in einen Baculovirus-Expressionsvektor umklontiert und in Insektenzellen exprimiert werden. Dieses Expressionssystem ist für seine hohe Produktivität bekannt und bietet gegenüber prokaryontischen Systemen den Vorteil, daß posttranslationale Modifizierungen wie z. B. Glykosilierungen ausgeführt werden. Die anschließende Reinigung der rekombinanten Proteine könnte über einen vom Vektor eingeführten N-terminalen Histidinanker mittels Metall-Chelat-Chromatographie erfolgen. Die biologische Aktivität der Proteine -die Voraussetzung für ihre Verwertbarkeit in Versuchen zur Kryo-Konservierung- läßt sich einfach über ihre Fähigkeit zur Gefrierpunktserniedrigung (SCHNEPPENHEIM, 1978) nachweisen.

## LITERATUR

HSIAO, K.-C., CHENG, C.-H.C., FERNANDES, I.E., DETRICH, W.H. AND DEVRIES, A.L.: An antifreeze glycopeptide gene from the

antarctic cod *Notothenia coriiceps neglecta* encodes a polyprotein of high peptide copy number *PNAS*(1990) **87**, 9265-9269

KNIGHT, C.A., WEN, D.Y. AND LAURSEN R.A.: Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallisation of ice *Cryobiology* (1995) **32**, 23-34

RUBINSKY, B., ARAV, A. AND DEVRIES, A.-L.: The Cryoprotective Effect of Antifreeze Glycopeptides from Antarctic Fishes *Cryobiology* (1992) **29**, 69-79

SCHNEPPENHEIM, R.: Zum Problem des Frostschutzes durch Peptide und Glycoproteine *Dissertation*, Mat. Nat. Fak., Univ. Kiel (1978)

YEH Y., FEENEY R.E., MCKOWN R.L. AND WARREN G.J. : Measurement of grain growth in the recrystallisation of rapidly rozen solutions of antifreeze glycoproteins. *Biopolymers* (1994) **34**, 1495-1504

Doris Steinemann  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie der CAU  
Schwanenweg 20  
24105 Kiel  
Germany